

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro**



**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Juni 2002 (20.06.2002)**

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/48180 A2

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :	C07K 7/00	MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/AT01/00387	
(22) Internationales Anmeldedatum:	7. Dezember 2001 (07.12.2001)	
(25) Einreichungssprache:	Deutsch	
(26) Veröffentlichungssprache:	Deutsch	
(30) Angaben zur Priorität:	A 2063/2000	12. Dezember 2000 (12.12.2000) AT
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US):	FIBREX MEDICAL RESEARCH & DEVELOPMENT GMBH [AT/AT]; Rabensteig 8/3A, A-1010 Wien (AT).	
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):	PETZELBAUER, Peter [AT/AT]; Breitenfurter Strasse 282/12, A-1230 Wien (AT).	
(74) Anwalt:	WIDTMANN, Georg; Clusiusgasse 2/8, A-1090 Wien (AT).	
(81) Bestimmungsstaaten (national):	AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(84) Bestimmungsstaaten (regional):	ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
Erklärungen gemäß Regel 4.17:		
— hinsichtlich der Identität des Erfinders (Regel 4.17 Ziffer i) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)		
— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)		

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Identität des Erfinders (Regel 4.17 Ziffer i) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PEPTIDES AND/OR PROTEINS AND USE THEREOF FOR THE PRODUCTION OF A THERAPEUTIC AND/OR PROPHYLACTIC MEDICAMENT

(54) Bezeichnung: PEPTIDE UND/ODER PROTEINE SOWIE VERWENDUNG DESSELBEN ZUR HERSTELLUNG EINES THERAPEUTISCHEN UND/ODER PRÄVENTIVEN ARZNEIMITTELS

$$\frac{R_1}{R_2} > N - \frac{H}{C} - \frac{O}{C} - Z_1 - Z_2 \quad (1)$$

thereof as well as, for example the amides thereof, or material mixtures thereof and/or with used for therapeutic and/or prophylactic applications in human and/or veterinary medicine.

(57) Abstract: The invention relates to peptides or proteins of general formula (I) (SEQ ID NO 1, 2) (I), where R₁ and R₂ independently = hydrogen, a saturated or unsaturated hydrocarbon group with 1 to 3, in particular up to 10 carbon atoms, Z₁ = a histidine or proline group, Z₂ = an arginine group, a peptide group or protein group with arginine at the initial terminus, in particular with 2 to 30 amino acids and the salts and mixtures thereof and/or with at least one further material. (I) can be used in man and/or veterinary medicine.

(57) Zusammenfassung: Peptide oder Proteine der allgemeinen Formel I (SEQ ID NO 1, 2) (I), worin R₁ und R₂ gleich oder unterschiedlich, Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 3, insbesondere bis 10, Kohlenstoffatomen Z₁ Histidin- oder Prolinrest, Z₂ Argininrest, ein Peptidrest oder Proteinrest mit anfangständigem Argininrest, insbesondere mit 2 bis 30 Aminosäuren, bedeuten sowie deren Salze, als auch z. B. Amide, oder Stoffgemische miteinander und/oder zumindest einem weiteren Stoff zu einer therapeutischen und/oder präventiven Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin.



GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,

RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung desselben
zur Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

Die Erfindung bezieht sich auf Peptide und/oder Proteine, Verwendung derselben zur Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven Arzneimittels sowie ein Arzneimittel.

Bisher in Prophylaxe und Therapie verwendete Substanzen zur Hemmung oder Verhinderung von Entzündungsreaktionen, sogenannte Immunsuppresiva, umfassen im wesentlichen zwei verschiedene Gruppen. Erstens Abkömmlinge eines im Körper natürlich vorkommenden Hormons, dem Cortison und zweitens körperfremde Immunsuppressiva, wie Cyclosporin und deren Derivate, Azathioprin, Cyclophosphamid usw. Diesen Substanzen ist eine antiinflammatorische Wirkung gemeinsam, jedoch haben diese Substanzen in der Langzeittherapie erhebliche Nebenwirkungen. Diese Nebenwirkungen limitieren eine langzeitige Therapie, daher werden diese Substanzen alternierend oder in Kombinationen eingesetzt, um Nebenwirkungen auf ein erträgliches Ausmaß zu reduzieren oder um die Therapie überhaupt fortsetzen zu können. Als Nebenwirkung seien die pathologischen Frakturen bei Cortison genannt, die durch den osteoporotischen Effekt des Cortisons verursacht sind oder das Nierenversagen, das durch Cyclosporin hervorgerufen werden kann. Diese Nebenwirkungen sind beiden Verbindungsgruppen obligat, es ist somit lediglich eine Frage der Therapiedauer und Gesamtdosis, wann die Therapie abgesetzt werden muß.

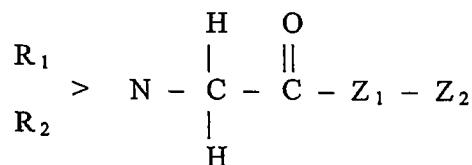
Der vorliegenden Erfindung ist zur Aufgabe gesetzt, neue Pharmazeutika zu schaffen, die geeignet sind, Entzündungsreaktionen zu verhindern oder zu hemmen und lediglich untergeordnete Nebenwirkungen aufweisen. Eine weitere Aufgabe besteht darin, eine Langzeittherapie zur Verfügung zu stellen.

- 2 -

Im folgenden werden die Aminosäuren der erfindungsgemäßen Peptide mit den üblichen Abkürzungen bezeichnet, wobei diese die α -Aminosäuren bezeichnen.

Mit „Analogen“ ist ein Peptid gemeint, das sich durch Derivatisierung, Substitution, vorzugsweise homologe Substitution, Deletion und/oder Insertion von der Sequenz des Fibrins und insbesondere den bevorzugten Sequenzen ableitet.

Die erfindungsgemäßen Peptide oder Proteine weisen die allgemeine Formel I (SEQ ID NO 1, 2)



worin R_1 und R_2 gleich oder unterschiedlich, Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 3, insbesondere bis 10, Kohlenstoffatomen

Z_1 Histidin- oder Prolinrest,

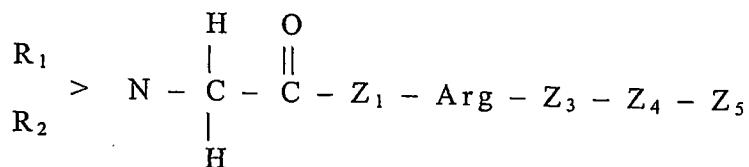
Z_2 Argininrest, ein Peptidrest oder Proteinrest mit anfangständigem Argininrest, insbesondere mit 2 bis 30 Aminosäuren,

bedeuten sowie deren Salze, als auch z. B. Amide, oder Stoffgemische miteinander und/oder zumindest einem weiteren Stoff zu einer therapeutischen und/oder präventiven Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin, wobei insbesondere nur L-Aminosäuren vorliegen.

Es war vollkommen überraschend, daß die definierte Aminosäuresequenz die Adhäsion von Zellen aus dem Blutstrom an

Endothelzellen der Gefäßwand und/oder ihre nachfolgende Transmigration aus dem Blut in das Gewebe verhindern.

Die erfindungsgemäßen Peptide oder Proteine weisen die allgemeine Formel II (SEQ ID NO 3 bis 10)



worin R_1 und R_2 gleich oder unterschiedlich, Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 3, insbesondere bis 10, Kohlenstoffatomen,

Z_1 Histidin- oder Prolinrest

Arg Argininrest

Z_3 Prolin- oder Valinrest

Z_4 Leucin- oder Valinrest

Z_5 Proteinrest oder Peptidrest, insbesondere mit 2 bis 30 Aminosäuren,
oder Alkoholrest mit 1 bis 3, insbesondere bis 10,
Kohlenstoffatomen
oder organischer oder anorganischer Basenrest

bedeuten, auf, sowie deren Salze, als auch z. B. Amide, oder Stoffgemische dieser miteinander und/oder zumindest einem weiteren Stoff zu einer therapeutischen und/oder präventiven Verwendung in der Human- und/ oder Veterinärmedizin, wobei insbesondere nur L-Aminosäuren vorliegen.

Es war vollkommen überraschend, daß Sequenzteile, Peptide oder Bruchstücke des Fibrinogens eine antiinflammatorische Wirkung aufweisen. Ohne durch diese theoretischen Überlegungen gebunden zu sein, könnte diese Wirkung darauf beruhen, daß das Fibrin über seinen neo-N-Terminus der Bbeta-

Kette an Endothelzellen und über die Sequenz der Aalpha-Kette an Zellen im Blutstrom bindet und so zur Adhäsion und Transmigration von Zellen ins Gewebe führt. Diese Verbindungen haben eine Nebenwirkung, und zwar wird die Fibrinbildung gehemmt. Diese Hemmung bedeutet jedoch für den Patienten keinen potentiellen Nachteil, da die Blutgerinnung auch in Abwesenheit von Fibrin bei banalen Verletzungen ausreichend ist. Lediglich bei chirurgischen Eingriffen könnte gegebenenfalls ein Absetzen einer derartigen Therapie zweckmäßig sein. Andere Nebenwirkungen sind im wesentlichen auszuschließen, da diese Substanzen nur mit den natürlichen Liganden interagieren. Weiters wird die natürliche Abwehr durch die Leukozyten im Blut nicht negativ beeinflußt. So bleibt die Zusammensetzung derselben, wie Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten unbeeinflußt, so daß der natürliche Abwehrprozeß erhalten bleibt und die Infektabwehr im Blut unverändert bleibt.

Fibrinogen wird in der Leber gebildet und ist in dieser Form biologisch inaktiv und befindet sich normalerweise in Konzentrationen um 3 g/l im Blut. Durch proteolitische Spaltung des Proenzyms Prothrombin wird Thrombin gebildet, welches vom Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B abspaltet. Dadurch wird Fibrinogen in seine biologisch aktive Form umgewandelt. Es entstehen Fibrin und Fibrinspaltprodukte.

Thrombin wird bei jeder Aktivierung der Blutgerinnung gebildet, also bei jedem Gewebeschaden, sei dieser entzündlicher, traumatischer oder degenerativer Genese. Die durch Thrombin medierte Bildung von Fibrin ist prinzipiell ein protektiver Vorgang, um entstandene Defekte im Gefäßsystem rasch abzudichten. Die Bildung von Fibrin ist jedoch auch ein pathogener Vorgang. Die Entstehung eines Fibrin thrombus als auslösende Ursache beim Herzinfarkt ist einer der prominentesten Probleme in der Humanmedizin.

Bisher nicht oder nicht ausreichend untersucht wurde die Rolle von Fibrin bei der Extravasation von Entzündungszellen aus dem Blutstrom ins Gewebe, ein einerseits erwünschter Vorgang bei der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen oder Tumorzellen im Gewebe, andererseits aber ein Vorgang, der durch sich selbst Gewebeschaden induziert oder weiter erhält. Fibrin bindet über seinen neo-N-Terminus der Bbeta an Endothelzellen mittels der Sequenz zu Bbeta und an Zellen im Blutstrom mittels der Sequenz Aalpha und führt so zur Adhäsion und Transmigration von Zellen ins Gewebe.

Die erfindungsgemäßen Peptide oder Proteine können die Adhäsion von Zellen aus dem Blutstrom an Endothelzellen der Gefäßwand und/oder ihre nachfolgende Transmigration aus dem Blut ins Gewebe verhindern.

Ein erfindungsgemäßes Peptid oder Protein der allgemeinen Formel II, worin Z_s ein Peptidrest mit folgender Aminosäuresequenz (SEQ ID NO 11):

Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala
Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg

und Z_1 Histidinrest
 Z_2 Argininrest
 Z_3 Prolinrest
 Z_4 Leucinrest

bedeuten, verhindert eine Ablagerung bzw. Anheftung von Fibrinbruchstücken an die Gefäßwand. Damit können Entzündungszellen an Endothelzellen der Gefäßwandung von Arterien und Venen nicht festgehalten werden und es wird verhindert, daß derartige Zellen an der Gefäßwandung verbleiben und so weiter in das Gewebe gelangen können.

Ein Peptid oder Protein der allgemeinen Formel II, worin Z_5 ein Peptidrest mit folgender Aminosäuresequenz (SEQ ID NO 12):

Glu Arg His Gln Ser Ala Cys Lys Asp Ser Asp Trp Pro
Phe Cys Ser Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Lys

und Z_1 Prolinrest

Arg Argininrest

Z_3 Valinrest

Z_4 Valinrest

bedeuten, bewirkt, daß Zellen des peripheren Blutes nicht an Fibrin oder Fibrinbruchstücken anhaften können und damit wird deren Migration im Gewebe verhindert.

Die beschriebenen Spaltprodukte sind auch in der Literatur als Peptid Bbeta und Peptid Aalpha bekannt. Dieser oben angeführte proadhesive und promigratorische Weg ist ein völlig neuer für das System der Steuerung der Wanderung von Zellen aus dem Blut in das Gewebe. Diese Funktion von Fibrin kann sowohl durch das Peptid Bbeta als auch durch das Peptid Aalpha blockiert werden.

Diese erfindungsgemäßen Peptide bieten sich daher als Therapeutikum bei Mensch und Tier an, um die Wanderung von Zellen aus dem Blut ins Gewebe zu blockieren. Da Fibrin oder andere Produkte des Fibrinogens, die durch proteolytische Spaltung entstehen, wie z. B. Urokinase-Plasminogen-Aktivator gespaltenes Fibrinogen nur spezifisch und regional begrenzt entstehen, also an Stellen von Entzündung, Gerinnungsstörung, Arteriosklerose, Thrombose und/oder Tumorwachstum, handelt es sich hierbei um ein regional beschränkt wirksames Therapeutikum, also pathologische Nebenwirkungen an anderen Orten sind nicht oder nur in beschränktem Ausmaß zu erwarten.

Bevorzugte und völlig unerwartete Anwendungsbereiche der erfundungsgemäßen Peptide und/oder Proteine liegen in der Herstellung von Arzneimitteln zur Therapie oder Prävention von lokalen und/oder generalisierten Entzündungen des Körpers bei infektiöser Genese, auf Basis einer Autoimmunreaktion, auf Basis einer rheumatischen Erkrankung, auf Basis einer Störung des Immunsystems, auf Basis einer genetischen Erkrankung, zur Prävention und/oder Therapie der Abstoßungsreaktion bei Organtransplantationen, der Arteriosklerose, des Reperfusionstraumas, auf Basis arteriosklerotischer und/oder thrombotischer Erkrankungen und vermehrter Fibrindepotition vor. Ein derartiges Peptid, insbesondere Bbeta, ist auch zur Herstellung eines Arzneimittels hervorragend geeignet, das den Transport eines weiteren Arzneimittels an menschliche oder tierische Endothelzellen bewerkstellt. Hierbei wird das zu transportierende Arzneimittel an einem Ende mit dem Peptid gekoppelt und lagert sich sodann an einer freien Stelle der Gefäßwandung, u. zw. an einer Endothelzelle, über VE-Cadherin an.

Im folgenden wird die Erfundung anhand der Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1:

Herstellung der Fibrinogenspaltprodukte:

Nicht polymerisierende Degradationsprodukte von Fibrinogen wurden durch Abbau mit Cyanogenbromid gemäß Blombäck et al. (Nature 1968, 218; 130-134) gewonnen. Das so abgebaute Fibrinogen besteht zum Großteil aus einem 63 kD Fragment, und zwar dem N-terminalen Disulfid Knoten, NDSK, und beinhaltet die Aalpha Kette 1-51, Bbeta Kette 1-118 und gamma Kette 1-78. Um NDSK-II zu erhalten (NDSK minus Fibrinopeptide A und B), wurden die N-terminalen Aminosäuren der Aalpha und Bbeta

Kette mit Thrombin (20 Einheiten/1 µg NDSK) in drei Stunden bei Raumtemperatur abgespalten und nachfolgend mit Diisopropylfluorophosphat zur Blockierung der Thrombinaktivität behandelt. Das so erhaltene NDSK-II bestand aus Aalpha Kette 17-51, Bbeta Kette 15-118 und gamma Kette 1-78.

Um NDSK-uPA zu erhalten, wurden 500 µg NDSK eine Stunde bei 37°C mit 200 Einheiten Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) der Firma Technoclone, Wien, Österreich, behandelt. Die Reaktion wurde mit 5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid abgebrochen. Das so erhaltene NDSK-uPA ist ein NDSK und weist kein Fibrinopeptid B auf.

Für Negativkontrollen wurde eine zweite Fraktion aus den durch Cyanogenbromid Behandlung entstandenen Fibrinogenspaltprodukten, genannt FCB-2 gemäß Nieuwenhuizen et al. (Biochem Biophys Acta 1983, 755; 531 – 533) gewonnen. FCB-2 ist ein 43 kD großes Protein und besteht aus der Aalpha Kette 148-208, der Bbeta Kette 191-305 und der gamma Kette 95-265. Dieses Protein wurde zu Kontrollzwecken ebenso mit Thrombin und mit Diisopropylfluorophosphat versetzt. Es führte jedoch zu keiner Änderung des Proteins (im folgenden FCB-2-thr genannt).

Für weitere Negativkontrollen wurde Kulturmedium (RPMI der Firma Life techn. Inc., Paisley, UK) mit Thrombin, wie oben behandelt und nachfolgend inaktiviert (RPMI-thr) oder mit uPA, wie oben behandelt und inaktiviert (RPMI-uPA).

Beispiel 2:

Das Peptid Aalpha (SEQ ID NO 12) entspricht den Aminosäuren 1 bis 28 und mit der Sequenz der alpha Kette des Fibrins und ist ident den Aminosäuren 17 bis 45 der Sequenz der Aalpha Kette des Fibrinogens:

- 9 -

Gly Pro Arg Val Val Glu Arg His Gln Ser Ala Cys Lys
Asp Ser Asp Trp Pro Phe Cys Ser Asp Glu Asp Trp Asn
Tyr Lys

Das Peptid Bbeta (SEQ ID NO 11) entspricht den Aminosäuren 1 bis 28 und mit der Sequenz der beta Kette des Fibrins, das ident mit den Aminosäuren 15 bis 43 der Sequenz der Bbeta Kette des Fibrinogens ist, das folgende Sequenz aufweist:

Gly His Arg Pro Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro
Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly
Tyr Arg

Beide Peptide wurden mittels Festphasen-Peptidsynthese gemäß Merrifield R. B., J. Amer. Chem. Soc. 1963; 85, 2149-2154 mit einem multiplen Peptidsynthesizer unter Anwendung einer Fluorenylmethyloxycarbonyl (FMOC)-Schutzgruppenstrategie gemäß Carpino L. A. und Han. G Y, J. Amer. Chem. Soc. 1981; 37; 3404-3409 synthetisiert. Die Reinigung der Rohpeptide erfolgte mittels präparativer reversed-phase HPLC über eine Nucleosil 100-10, C18 Säule gemäß Engelhart H. und Müller H. Chromatography 1984 19:77 sowie Henschen A., Hupe K. P. und Lottspeich F. High Performance Liquid Chromatography VCH 1985. Als Kontrollpeptide wurden Peptide mit derselben Länge aber mit randomisierter Aminosäuresequenz verwendet.

Beispiel 3:

HU-SCID Maus Modell:

Humane Haut wurde auf den Rücken von SCID Mäusen transplantiert und zwei Wochen danach humane Lymphozyten in das Peritoneum injiziert. Es wurde gemäß Petzelbauer et al. (J. Invest. Dermatol. 1996, 107; 576 - 581) verfahren. Es wurde

- 10 -

sodann jeweils fünfzehn derartig präparierten Mäusen in die Schwanzvene injiziert:

- a) 100 µg humanes NDSK-II
- b) 100 µg humanes FCB-2
- c) 100 µg Peptid Aalpha
- d) 100 µg Peptid Bbeta
- e) 100 µg randomisiertes Aalpha
- f) 100 µg randomisiertes Bbeta

Vierundzwanzig Stunden danach wurde die humane Haut entnommen und die Anzahl der Entzündungssstellen, ausgedrückt in Zellen pro 0,3 mm², ermittelt und das Mittel mit Standardabweichung bestimmt.

Bei a: 22 +/- 2,8
bei b: 9 +/- 2,1
bei c: 4 +/- 1,1
bei d: 6 +/- 1,1
bei e: 5 +/- 1,2
bei f: 7 +/- 1,3

Daraus ist abzuleiten, daß NDSK-II zu Entzündungen führt, und es wurde dieses Protein infolge als pathogene Substanz eingesetzt. Die anderen Verbindungen zeigen für sich keine signifikante Erhöhung der Entzündungszellen.

Vergleichsbeispiel 4:

Fünfzehn Mäusen gemäß Beispiel 3 wurden

100 µg humanes NDSK-II und
100 µg randomisiertes Peptid Aalpha

- 11 -

in die Schwanzvene injiziert. Es wurde gemäß Beispiel 3 weiterverfahren. Es konnten 23 +/- 3,5 Entzündungsstellen pro 0,3 mm² ermittelt werden.

Vergleichsbeispiel 5:

Fünfzehn Mäusen gemäß Beispiel 3 wurden

100 µg humanes NDSK-II gemäß Beispiel 1 und
100 µg randomisiertes Peptid Bbeta

in die Schwanzvene injiziert. Es wurde gemäß Beispiel 3 weiterverfahren. Es konnten 24 +/- 2 Entzündungsstellen pro 0,3 mm² ermittelt werden.

Beispiel 6:

Fünfzehn Mäusen gemäß Beispiel 3 wurden

100 µg humanes NDSK-II und
100 µg synthetisiertes Peptid Aalpha

injiziert. Es wurde gemäß Beispiel 3 weiterverfahren. Es konnten 21 +/- 2,2 Entzündungsstellen pro 0,3 mm² ermittelt werden.

Beispiel 7:

Fünfzehn Mäusen gemäß Beispiel 3 wurden

100 µg humanes NDSK-II und
100 µg synthetisiertes Peptid Bbeta

- 12 -

in die Schwanzvene injiziert. Es wurde gemäß Beispiel 3 weiterverfahren. Es konnten $14 +/- 2$ Entzündungsstellen pro $0,3 \text{ mm}^2$ ermittelt werden.

Den Beispielen 4 bis 7 ist zu entnehmen, daß das Peptid Bbeta die lymphozytäre Entzündung blockiert.

Vergleichsbeispiel 8:

Humane umbilikale Venen Endothelzellen (HUVEC) wurden mit rotem Floureszenzfarbstoff markiert (Cell Tracker Orange, $1 \mu\text{l}/\text{ml}$, Molecular Probes, Eugene, OR) und auf einer Kollagenmatrix (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) ausgesät. Nach Konfluenz der Endothelzellen wurden mit grünem Floureszenzfarbstoff (Cell Tracker Green, $1 \mu\text{l}/\text{ml}$, Molecular Probes der Firma Eugene Origon) markierte periphere Blut mononukleare Zellen (PBMC) (10^5 Zellen pro 25 mm^2) überschichtet. Danach wurden die Zellen für zwölf Stunden auf 37°C inkubiert.

Adhärierende und ins Gel transmigrierte Zellen wurden mit einem Laserscanmikroskop fotografiert, in Pixel transformiert und mittels „NIH image“ gemäß Gröger et al. (J. Immunol. Method 1999; 222: 101-109) ausgewertet.

Die Anzahl der adhärenten Zellen pro $0,1 \text{ mm}^2$ konnte, wie unter Adhäsion angeführt, ermittelt werden. Die Anzahl der migrierten Zellen pro $0,04 \text{ mm}^2$ konnte, wie unter Migration angeführt, ermittelt werden. Es wurde der Mittelwert von dreimal drei Versuchen gemeinsam mit der Standardabweichung bestimmt.

		Adhäsion	Migration
a) RPMI-uPA	0,1 µg/ml	40 +/- 4	4 +/- 3
	1,0 µg/ml	38 +/- 2	5 +/- 2
	10,0 µg/ml	32 +/- 4	5 +/- 1
b) NDSK	0,1 µg/ml	31 +/- 18	6 +/- 3
	1,0 µg/ml	35 +/- 18	5 +/- 2
	10,0 µg/ml	36 +/- 24	6 +/- 3
c) NDSK-II	0,1 µg/ml	55 +/- 21	12 +/- 5
	1,0 µg/ml	67 +/- 31	19 +/- 12
	10,0 µg/ml	65 +/- 31	19 +/- 10
d) NDSK-uPA	0,1 µg/ml	58 +/- 3	10 +/- 2
	1,0 µg/ml	60 +/- 3,5	14 +/- 3
	10,0 µg/ml	65 +/- 3	18 +/- 1,5
e) FCB2	0,1 µg/ml	30 +/- 26	6 +/- 4
	1,0 µg/ml	10 +/- 10	3 +/- 2
	10,0 µg/ml	21 +/- 7	5 +/- 4
f) FCB-2-thr	0,1 µg/ml	20 +/- 12	6 +/- 5
	1,0 µg/ml	23 +/- 13	7 +/- 5
	10,0 µg/ml	26 +/- 11	4 +/- 2
g) RPMI-thr	0,1 µg/ml	29 +/- 15	4 +/- 5
	1,0 µg/ml	26 +/- 14	5 +/- 5
	10,0 µg/ml	41 +/- 20	5 +/- 4

Daraus ist abzuleiten, daß NDSK-II mehr als NDSK-uPA zu signifikanten Migrationen von peripheren Blut-monozellulären Zellen (PBMC) führt und daher pathogen wirkt. Keine der Kontrollen a), b), e), f) und g) führten zu einer signifikanten Migration.

Beispiel 9:

Die Kollagenmatrix gemäß Beispiel 8 mit der Suspension aus PBMC wurde mit 100 µg NDSK-II und Bbeta oder Bbeta randomisiert versetzt, und es wurde gemäß Beispiel 8 weiterverfahren.

		Adhäsion	Migration
a)	kein Zusatz von NDSK-II	38 +/- 15	6 +/- 4
b)	nur 100 µg NDSK-II	73 +/- 29	16 +/- 7
c)	10 µg Bbeta + NDSK-II	63 +/- 33	7 +/- 4
d)	100 µg Bbeta + NDSK-II	47 +/- 34	5 +/- 4
e)	1000 µg Bbeta + NDSK-II	52 +/- 27	10 +/- 6
f)	10 µg Bbeta randomisiert + NDSK-II	77 +/- 33	16 +/- 6
g)	100 µg Bbeta randomisiert + NDSK-II	86 +/- 35	15 +/- 6
h)	1000 µg Bbeta randomisiert + NDSK-II	78 +/- 31	13 +/- 8

Wie diesen Versuchsergebnissen zu entnehmen, blockiert das Peptid Bbeta Entzündungen.

Beispiel 10:

Die Kollagenmatrix gemäß Beispiel 8 mit der Suspension aus PBMC wurde mit 100 µg NDSK-II und Aalpha oder Aalpha randomisiert versetzt, und es wurde gemäß Beispiel 8 weiterverfahren.

		Adhäsion	Migration
a)	kein Zusatz von NDSK-II	42 +/- 6	10 +/- 1
b)	nur NDSK-II	96 +/- 11	24 +/- 3
c)	10 µg Aalpha + NDSK-II	69 +/- 12	21 +/- 4
d)	100 µg Aalpha + NDSK-II	73 +/- 13	15 +/- 6
e)	1000 µg Aalpha + NDSK-II	70 +/- 6	13 +/- 5
f)	10 µg Aalpha randomisiert + NDSK-II	70 +/- 6	25 +/- 2

g) 100 µg Aalpha randomisiert + NDSK-II 65 +/- 16 24 +/- 3
 h) 1000 µg Aalpha randomisiert + NDSK-II 70 +/- 12 26 +/- 3

Aus den Versuchsergebnissen läßt sich ableiten, daß das Peptid Aalpha nur teilweise die Migration von PBMC blockiert.

Beispiel 11:

Da PBMC im wesentlichen aus einem Gemisch von Lymphozyten und Monozyten besteht, wurden im Beispiel 11 reine Lymphozyten anstelle von PBMC (wie in den Beispielen 8 – 10) verwendet.

Die Kollagenmatrix gemäß Beispiel 8 mit Endothelzellen und Lymphozyten wurde mit 100 µg NDSK-uPA bzw. 100 µg NDSK-II und Aalpha bzw. Bbeta versetzt.

		Adhäsion	Migration
a)	kein Zusatz	68 +/- 8	16 +/- 3
b)	NDSK-uPA	143 +/- 11	53 +/- 5
c)	NDSK-II	119 +/- 11	43 +/- 4
d)	nur 100 µg Bbeta	58 +/- 18	14 +/- 1
e)	NDSK-uPA + 100 µg Bbeta	74 +/- 8	19 +/- 2
f)	NDSK-II + 100 µg Bbeta	74 +/- 8	17 +/- 3
g)	nur 100 µg Aalpha	77 +/- 4	18 +/- 1
h)	NDSK-uPA + 100 µg Aalpha	131 +/- 4	40 +/- 3
i)	NDSK-II + 100 µg Aalpha	131 +/- 4	44 +/- 4
j)	nur 100 µg Bbeta randomisiert	75 +/- 5	19 +/- 1
k)	NDSK-uPA + 100 µg Bbeta randomisiert	134 +/- 13	46 +/- 4
l)	NDSK-II + 100 µg Bbeta randomisiert	120 +/- 12	42 +/- 4

Aus diesen Versuchsergebnissen folgt:

- 1) daß sowohl NDSK-II als auch NDSK-uPA die Lymphozyten Entzündung fördern,
- 2) daß das Peptid Bbeta die durch NDSK-II und NDSK-uPA induzierte Lymphozyten Adhäsion und Migration zur Gänze blockiert, hingegen das Peptid Aalpha keinen blockierenden Effekt hat, woraus anzunehmen ist, daß die freie Alpha Kette zur Induktion der Adhäsion und Migration der Lymphozyten nicht benötigt wird.

Beispiel 12:

Es wurde gemäß Beispiel 11 verfahren, jedoch anstelle der Lymphozyten wurden reine Monozyten verwendet. Es wurde 100 µg NDSK-uPA bzw. 100 µg NDSK-II mit Peptid Aalpha, randomisiertem Aalpha, Bbeta oder randomisierte, Bbeta ver- setzt.

		Adhäsion	Migration
a)	kein Zusatz	43 +/- 8	7 +/- 1
b)	NDSK-uPA	48 +/- 10	10 +/- 2
c)	NDSK-II	90 +/- 11	19 +/- 6
d)	100 µg Bbeta	59 +/- 7	5 +/- 1
e)	NDSK-uPA + 100 µg Bbeta	61 +/- 11	8 +/- 3
f)	NDSK-II + 100 µg Bbeta	70 +/- 7	7 +/- 5
g)	100 µg Bbeta randomisiert	40 +/- 7	6 +/- 1
h)	NDSK-uPA + 100 µg Bbeta randomisiert	45 +/- 5	8 +/- 3
g)	NDSK-II + 100 µg Bbeta randomisiert	92 +/- 10	20 +/- 7
j)	100 µg Aalpha	59 +/- 6	5 +/- 1
k)	NDSK-uPA + 100 µg Aalpha	62 +/- 4	8 +/- 5
l)	NDSK-II + 100 µg Aalpha	68 +/- 10	9 +/- 6
m)	100 µg Aalpha randomisiert	58 +/- 7	6 +/- 1

- 17 -

n)	NDSK-uPA + 100 µg Aalpha randomisiert	50 +/- 10	10 +/- 4
o)	NDSK-II + 100 µg Aalpha randomisiert	108 +/- 8	21 +/- 5

Aus diesen Versuchsergebnissen folgt, daß nur NDSK-II und nicht NDSK-uPA die Wanderung von Monozyten fördert, also sowohl Alpha Kette als auch die Beta Kette ein freies N-terminales Ende aufweisen müssen und die Wanderung der Monozyten blockieren.

Beispiel 13:

Es wurde gemäß Beispiel 11 verfahren, es wurden reine Lymphozyten verwendet. Es wurde 100 µg NDSK-uPA bzw. 100 µg NDSK-II mit den kurzen Peptidsalzen abgeleitet von Aalpha Gly Pro Arg (Pro)-NH₂ acetat (Aalpha-derivat) oder abgeleitet von Bbeta Gly His Arg Pro-OH acetat (Bbeta-derivat) versetzt.

		Adhäsion	Migration
a)	kein Zusatz	60 +/- 8	14 +/- 1
b)	NDSK-uPA	149 +/- 12	57 +/- 5
c)	NDSK-II	121 +/- 11	48 +/- 7
d)	nur 100 µg Bbeta-derivat	58 +/- 10	12 +/- 9
e)	NDSK-uPA + 100 µg Bbeta-derivat	70 +/- 8	16 +/- 3
f)	NDSK-II + 100 µg Bbeta-derivat	69 +/- 7	14 +/- 5
g)	nur 100 µg Aalpha-derivat	77 +/- 4	18 +/- 1
h)	NDSK-uPA + 100 µg Aalpha-derivat	134 +/- 4	48 +/- 5
i)	NDSK-II + 100 µg Aalpha-derivat	131 +/- 7	49 +/- 6
j)	nur 100 µg Bbeta-derivat randomisiert	70 +/- 5	14 +/- 7
k)	NDSK-uPA + 100 µg Bbeta-derivat randomisiert	130 +/- 12	49 +/- 6

- 18 -

1)	NDSK-II + 100 µg Bbeta-derivat randomisiert	120 +/- 10	55 +/- 8
----	--	------------	----------

Aus diesem Experiment ergibt sich, daß bei Hemmung der Lymphozytenmigration diese kurzen Peptide in entsprechender kontinuierlicher Zugabe gleich wirksam wie die langen Peptide sind.

Beispiel 14:

Es wurde gemäß Beispiel 12 verfahren, es wurden reine Monozyten verwendet. Es wurde 100 Mg NDSK-uPA bzw. 100 µg NDSK-II mit den kurzen Peptidsalzen Aalpha Gly Pro Arg (Pro)-NH₂ acetat (Aalpha-derivat) oder Bbeta Gly His Arg Pro-OH acetat (Bbeta-derivat) versetzt.

		Adhäsion	Migration
a)	kein Zusatz	40 +/- 8	5 +/- 1
b)	NDSK-uPA	54 +/- 9	7 +/- 2
c)	NDSK-II	85 +/- 11	22 +/- 6
d)	100 µg Bbeta-derivat	52 +/- 7	6 +/- 1
e)	NDSK-uPA + 100 µg Bbeta-derivat	61 +/- 11	8 +/- 3
f)	NDSK-II + 100 µg Bbeta-derivat	68 +/- 7	8 +/- 4
g)	100 µg Bbeta-derivat randomisiert	40 +/- 7	6 +/- 1
h)	NDSK-uPA + 100 µg Bbeta-derivat randomisiert	44 +/- 6	8 +/- 2
i)	NDSK-II + 100 µg Bbeta-derivat randomisiert	92 +/- 10	23 +/- 7
j)	100 µg Aalpha-derivat	50 +/- 5	4 +/- 4
k)	NDSK-uPA + 100 µg Aalpha-derivat	60 +/- 5	7 +/- 6
l)	NDSK-II + 100 µg Aalpha-derivat	64 +/- 11	8 +/- 2
m)	100 µg Aalpha-derivat randomisiert	54 +/- 10	6 +/- 3
n)	NDSK-uPA + 100 µg Aalpha-derivat randomisiert	50 +/- 10	10 +/- 4

- 19 -

o) NDSK-II + 100 µg Aalpha-derivat
randomisiert 99 +/- 8 21 +/- 7

Aus diesem Experiment ergibt sich, daß bei Hemmung der Monozytenmigration diese kurzen Peptide in entsprechender kontinuierlicher Zugabe gleich wirksam wie die langen Peptide sind.

Beispiel 15:

Die Versuche wurden mit männlichen Wistaratten mit einem Gewicht zwischen 220 g und 280 g durchgeführt. Die Ratten wurden mit einer Standarddiät und Wasser ernährt. Für die Durchführung des Versuches wurden die Ratten anästasiert und es erfolgte eine künstliche Beatmung mit einer Frequenz von 70 Pulsen pro Minute, wobei 8 ml bis 10 ml pro Kilogramm eines Gases mit 30 Vol.-% Sauerstoff mit einem Überdruck von 1 mm bis 2 mm Quecksilber abgegeben wurde. Die rechte Herzerterie wurde mit einer Meßkanüle versehen, und der Blutdruck in der Arterie als auch die Schläge wurden bestimmt. Die Druckrate wurde bestimmt als Produkt des Blutdruckes in der Arterie und der Herzschlagrate mit der Dimension mm Quecksilber / Minute / 10^3 . Die rechte Vene wurde mit einer Meßkanüle für die Dotation der Versuchssubstanzen versehen. Nach der chirurgischen Vorbereitung wurden 2 ml Rattenblut dem Herzen zugeführt. Nach dreißig Minuten wurde die linken Herzerterie verschlossen. Nach weiteren fünfundzwanzig Minuten wurde der Verschluß gelöst, um das ischämische Areal wieder zu durchbluten. Zu diesem Zeitpunkt wurden der Hälfte der Tiere 800 µg/kg Peptid Bbeta bzw. Peptid Bbeta randomisiert intravenös verabreicht und sodann zwei Stunden verstreichen gelassen.

Um zwischen geschädigtem und nicht geschädigtem Gewebe des Herzens zu unterscheiden, wurde dann der linken Herzerterie

evans blue dye in einer Konzentration von 2 Gew.-% zugegeben. Das entnommene Herz wurde sodann mit fünf horizontalen Schnitten geteilt, die rechte Venenwand entfernt und die Schnitte mit Triphenyltetratolchlorid (1 Gew.-%) zwanzig Minuten lang bei 37°C behandelt, um zwischen normalem und Infarktgewebe zu unterscheiden. Die Schnitte wurden mit Computer unterstützter Planimetrie ausgewertet.

Durch den Gefäßverschluß waren im Herzen der Vergleichsratten 62,5 % des Herzmuskels bedroht, in den Herzen der Versuchsratten 60 %. In den Vergleichsrattenherzen waren 46 % des bedrohten Gewebes abgestorben, hingegen in den Herzen der Versuchsratten 29 %. Dies entspricht einer 37 %igen Reduktion des abgestorbenen Gewebes ($p < 0,05$).

Die erfindungsgemäßen Substanzen bzw. die Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen zur Herstellung eines Arzneimittels sind von besonderer Bedeutung:

Bei einem Arzneimittel zur Therapie von Erkrankungen, die durch gewebsschädigende Wirkung von autoreaktiven Lymphozyten entstehen.

Hierzu zählen Erkrankungen aus dem Formenkreis der Autoimmunität, wie z. B. Kollagenosen, rheumatische Erkrankungen, Psoriasis und post-/parainfektiöse Erkrankungen und Erkrankungen, die durch eine Graft versus Host Reaktion entstehen. Eine heilende Wirkung tritt ein, da dieses Arzneimittel die Wanderung der Lymphozyten ins Gewebe blockiert. Die Lymphozyten bleiben somit im Blutstrom und können keine autoreaktive gewebsschädigende Wirkung erzeugen.

Bei einem Arzneimittel zur Therapie und/oder Prävention von Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen tritt eine heilende Wirkung ein, da dieses Arzneimittel die Wanderung von Lymphozyten aus dem Blutstrom in das Fremdorgan verhindert und somit das Fremdorgan nicht durch autoreaktive Lymphozyten zerstört werden kann.

Bei einem Arzneimittel zur Therapie und/oder Prävention von Arteriosklerose bei Organtransplantationen tritt eine heilende Wirkung ein, da dieses Arzneimittel die Wanderung von Lymphozyten und Monozyten in die Gefäßwand und somit die Aktivierung der Zellen der Gefäßwand unterbindet. Damit wird die Arteriosklerose im Gefolge von Organtransplantationen minimiert oder unterbunden.

Bei einem Arzneimittel zur Therapie und/oder Prävention des Reperfusionstraumas nach chirurgisch oder pharmazeutisch induzierter Wiederdurchblutung, wie z. B. nach Herzinfarkt, Schlaganfall, nach Gefäßoperationen, Bypassoperationen und Organtransplantationen, tritt eine heilende Wirkung ein, da dieses Arzneimittel die Wanderung von Lymphozyten und Monozyten in die Gefäßwand hemmt. Das Reperfusionstrauma entsteht durch Sauerstoffmangel/Azidose der Zellen des Gefäßes während der Wiederdurchblutung und führt zu deren Aktivierung. Dadurch haften Lymphozyten und Monozyten an der Gefäßwand und wandern in diese ein. Die Unterbindung der Anhaftung und Einwanderung von Lymphozyten und Monozyten in die Gefäßwand lässt den Hypoxie/ Azidose-induzierten Schaden abklingen, ohne daß durch die nachfolgende Entzündungsreaktion ein bleibender Gefäßschaden entsteht.

Bei einem Arzneimittel zur Therapie und/oder Prävention der Arteriosklerose im Gefolge von Stoffwechselerkrankungen oder Alterungsprozessen tritt eine heilende Wirkung ein, da dieses

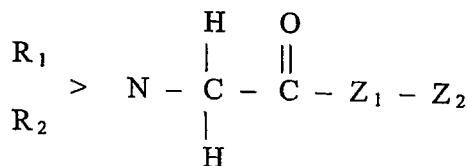
Arzneimittel die Wanderung von Lymphozyten und Monozyten in die Gefäßwand hemmt und damit die daraus resultierende Progression der arteriosklerotischen Plaque hemmt.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann auch zum Transport eines weiteren Arzneimittels eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Arzneimittel bindet spezifisch ein Oberflächenmolekül an Endothelzellen. Damit können daran gekoppelte Arzneimittel an Endothelzellen in hoher Konzentration gebracht werden, ohne daß diese an anderen Stellen Nebenwirkungen erzeugen können. Als Beispiel sei hier die Verwendung von zellteilungshemmenden Substanzen genannt, die spezifisch an Endothelzellen herangeführt eine antiangiogenetische Wirkung ausüben können. Eine heilende Wirkung tritt hier bei Tumorpatienten ein, da das Tumorwachstum durch eine Verhinderung der Endothellzellproliferation und damit durch eine Verhinderung der Neoangiogenese blockiert wird.

Patentansprüche:

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Peptide oder Proteine der allgemeinen Formel I (SEQ ID NO 1, 2)

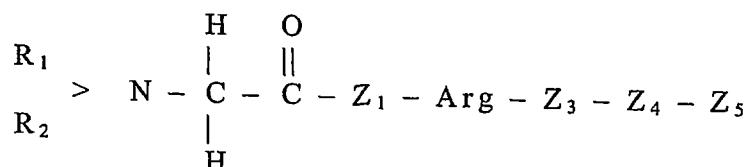


worin R_1 und R_2 gleich oder unterschiedlich, Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 3, insbesondere bis 10, Kohlenstoffatomen

Z_1 Histidin- oder Prolinrest,
 Z_2 Argininrest, ein Peptidrest oder Proteinrest mit anfangständigem Argininrest, insbesondere mit 2 bis 30 Aminosäuren,

bedeuten sowie deren Salze, als auch z. B. Amide, oder Stoffgemische miteinander und/oder zumindest einem weiteren Stoff zu einer therapeutischen und/oder präventiven Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin.

2. Peptide oder Proteine nach Anspruch 1 der allgemeinen Formel II (SEQ ID NO 3 bis 10)



worin R_1 und R_2 gleich oder unterschiedlich, Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 3, insbesondere bis 10, Kohlenstoffatomen,

Z₁ Histidin- oder Prolinrest
Arg Argininrest
Z₃ Prolin- oder Valinrest
Z₄ Leucin- oder Valinrest
Z₅ Proteinrest oder Peptidrest, insbesondere mit 2 bis 30 Aminosäuren,
oder Alkoholrest mit 1 bis 3, insbesondere bis 10,
Kohlenstoffatomen
oder organischer oder anorganischer Basenrest

bedeuten sowie deren Salze, als auch z. B. Amide, oder Stoffgemische dieser miteinander und/oder zumindest einem weiteren Stoff zu einer therapeutischen und/oder präventiven Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin.

3. Peptide oder Proteine nach Anspruch 2, worin Z₅ ein von der Aalpha-Kette des Fibrins abgeleiteter Peptidrest ist.
4. Peptide oder Proteine nach Anspruch 2, worin Z₅ ein von der Bbeta-Kette des Fibrins abgeleiteter Peptidrest ist.
5. Peptide oder Proteine der allgemeinen Formel II nach Anspruch 2, worin Z₅ ein Peptidrest mit folgender Aminosäuresequenz (SEQ ID NO 11):

Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro
Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg

und Z₁ Histidinrest
Arg Argininrest
Z₃ Prolinrest
Z₄ Leucinrest

bedeuten.

6. Peptide oder Proteine nach Anspruch 2 der allgemeinen Formel II, worin Z_5 ein Peptidrest mit folgender Aminosäuresequenz (SEQ ID NO 12):

Glu Arg His Gln Ser Ala Cys Lys Asp Ser Asp Trp
Pro Phe Cys Ser Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Lys

und Z_1 Prolinrest
Arg Argininrest
 Z_3 Valinrest
 Z_4 Valinrest

bedeuten.

7. Verwendung von Peptiden und/oder Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von lokalen und/oder generalisierten Entzündungen des Körpers infektiöser Genese.
8. Verwendung von Peptiden und/oder Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von lokalen und/oder generalisierten Entzündungen des Körpers auf Basis einer Autoimmunreaktion.
9. Verwendung von Peptiden und/oder Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von lokalen und/oder generalisierten Entzündungen des Körpers auf Basis einer rheumatischen Erkrankung.
10. Verwendung von Peptiden und/oder Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von lokalen und/oder generalisierten Entzündungen des Körpers auf Basis einer Störung des Immunsystems.

11. Verwendung von Peptiden und/oder Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von lokalen und/oder generalisierten Entzündungen des Körpers auf Basis einer genetischen Erkrankung.
12. Verwendung von Peptiden und/oder Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention und/oder Therapie der Abstoßungsreaktion bei Organtransplantationen, der Arteriosklerose, des Reperfusionsstraumas, arteriosklerotischer Erkrankungen und/oder vermehrter Fibrindepots im Alterungsprozeß.
13. Verwendung von Peptiden und/oder Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention und/oder Therapie der Arteriosklerose bei Organtransplantationen.
14. Verwendung von Peptiden und/oder Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention und/oder Therapie des Reperfusionsstraumas.
15. Verwendung von Peptiden und/oder Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention und/oder Therapie arteriosklerotischer und/ oder thrombotischer Erkrankungen.
16. Verwendung von Peptiden und/oder Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention und/oder Therapie der vermehrten Fibrindepots im Alterungsprozeß.
17. Verwendung von Peptiden und/oder Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Herstellung eines Arzneimittels zum

- 27 -

Transport eines weiteren Arzneimittels an menschlichen oder tierischen Endothelzellen.

18. Arzneimittel enthaltend zumindest ein Peptid und/oder Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 17.

19. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 18 in für eine Injektion geeigneter Form.

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 1

<211> 32

<212> Peptid

<400> Gly His Arg X_{aa2} X_{aa29}

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 2

<211> 32

<212> Peptid

<400> Gly Pro Arg X_{aa2} X_{aa29}

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 3

<211> 7 bis 35

<212> Peptid

<400> Gly His Arg Pro Val X_{aa2} X_{aa30}

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 4

<211> 7 bis 32

<212> Peptid

<400> Gly His Arg Val Val X_{aa2} X_{aa30}

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 5

<211> 7 bis 35

<212> Peptid

<400> Gly Pro Arg Pro Val X_{aa2} X_{aa30}

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 6

<211> 7 bis 35

<212> Peptid

<400> Gly Pro Arg Val Val X_{aa2} X_{aa30}

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 7

<211> 7 bis 35

<212> Peptid

<400> Gly Pro Arg Pro Leu X_{aa2} X_{aa30}

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 8

<211> 7 bis 35

<212> Peptid

<400> Gly His Arg Pro Leu

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 9

<211> 7 bis 35

<212> Peptid

<400> Gly Pro Arg Val Leu X_{aa2} X_{aa30}

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 10

<211> 7 bis 35

<212> Peptid

<400> Gly His Arg Val Leu X_{aa2} X_{aa30}

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 11

<211> 28

<212> Peptid

<400> Gly His Arg Pro Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu
Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro Pro Ile
Ser Gly Gly Gly Tyr Arg

Sequenzprotokoll

<110> FIBREX Medical Research und Development GesmbH /
Petzelbauer Peter

<120> Peptide und/oder Proteine sowie Verwendung derselben zur
Herstellung eines therapeutischen und/oder präventiven
Arzneimittels

<130>

<140>

<141>

<150> AT 2063/2000

<151> 2000 12 12

<160> 12

<170> Microsoft Windows NT, Workstation 4.0, Office 97

<210> 12

<211> 28

<212> Peptid

<400> Gly Pro Arg Val Val Glu Arg His Gln Ser Ala
Cys Lys Asp Ser Asp Trp Pro Phe Cys Ser Asp
Glu Asp Trp Asn Tyr Lys

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Juni 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/048180 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/75,
5/083, 5/103, A61K 38/36, 38/06, 38/07

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT01/00387

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Dezember 2001 (07.12.2001)

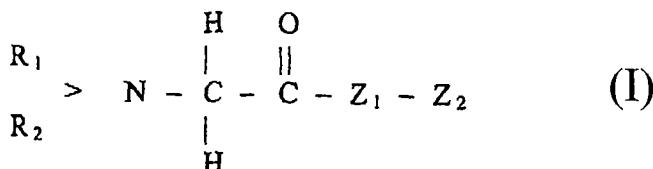
Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Identität des Erfinders (Regel 4.17 Ziffer i) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PEPTIDES AND/OR PROTEINS AND USE THEREOF FOR THE PRODUCTION OF A THERAPEUTIC AND/OR PROPHYLACTIC MEDICAMENT

(54) Bezeichnung: PEPTIDE UND/ODER PROTEINE SOWIE VERWENDUNG DESSELBEN ZUR HERSTELLUNG EINES THERAPEUTISCHEN UND/ODER PRÄVENTIVEN ARZNEIMITTELS



as well as, for example the amides thereof, or material mixtures thereof and/or with at least one further material. (I) can be used for therapeutic and/or prophylactic applications in human and/or veterinary medicine.

WO 02/048180 A3

(57) Zusammenfassung: Peptide oder Proteine der allgemeinen Formel (I), worin R₁ und R₂ gleich oder unterschiedlich, Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 3, insbesondere bis 10, Kohlenstoffatomen: Z₁ Histidin- oder Prolinrest; Z₂ Argininrest, ein Peptidrest oder Proteinrest mit anfangständigem Argininrest, insbesondere mit 2 bis 30 Aminosäuren, beudeuten sowie deren Salze, als auch z. B. Amide, oder Stoffgemische miteinander und/oder zumindest einem weiteren Stoff zu einer therapeutischen und/oder präventiven Verwendung in der Human- und/oder Veterinärmedizin.

(57) Abstract: The invention relates to peptides or proteins of general formula (I), where R₁ and R₂ independently = hydrogen, a saturated or unsaturated hydrocarbon group with 1 to 3, in particular up to 10 carbon atoms, Z₁ = a histidine or proline group, Z₂ = an arginine group, a peptide group or protein group with arginine at the initial terminus, in particular with 2 to 30 amino acids and the salts thereof



- *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) — Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*
- *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)*

Veröffentlicht:

- *mit internationalem Recherchenbericht*

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:

30. Januar 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

nat Application No

PCT/AT 01/00387

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/75 C07K5/083 C07K5/103 A61K38/36 A61K38/06
A61K38/07

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARENBERG J ET AL.: "Biodistribution of human fibrinogen-derived peptides in rabbits; in: Fibrinogen: Struct. Variants Interact." 1983, DE GRUYTER, BERLIN (DE) XP008008830 page 271 -page 278	1-5
Y		7-19
X	WO 93 21962 A (DIATECH, INC.) 11 November 1993 (1993-11-11) page 10; claim 4	1-5
X	IKEMATSU S: "Radioimmunoassay of fibrinopeptide" RINSHO KENSA, vol. 28, no. 1, 1984, pages 20-24, XP001115011 table 2	1-5

	-/-	

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

3 October 2002

18/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmidt, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 01/00387

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAWASAKI K ET AL.: "Amino acids and peptides XII: Synthetic peptides related to the N-terminal portion of fibrin alpha-chain and their inhibitory effects on fibrinogen/thrombin clotting" THROMBOSIS RESEARCH, vol. 56, 1989, pages 757-762, XP008008821 the whole document ----	1-4
X	DE 197 29 591 A (THERASORB MEDIZINISCHE SYSTEME GMBH) 11 February 1999 (1999-02-11) page 4; claims 1,3 ----	1-4
X	EVERSE SJ ET AL.: "Conformational Changes in Fragments D and Double-D from Human Fibrin(ogen) upon Binding the Peptide Ligand Gly-His-Arg-Pro-Amide" BIOCHEMISTRY, vol. 38, 18 February 1999 (1999-02-18), pages 2941-2946, XP002215499 abstract ----	1-4
X	US 4 927 916 A (MATSUEDA ET AL.) 22 May 1990 (1990-05-22) claim 1 ----	1-4
Y	HERRICK S ET AL.: "Fibrinogen" THE INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY, vol. 31, 1999, pages 741-746, XP002215500 page 744 -page 745; table 1 ----	7-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AT 01/00387

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely

1. Claims: 5 (completely) and 1-4, 7-19 (in part)

Peptides of general formula II, in which Z_5 has the amino acid sequence Seq Id No. 11, and their uses.

2. Claims: 6 (completely) and 1-4, 7-19 (in part)

Peptides of general formula II, in which Z_5 has the amino acid sequence Seq Id No. 12, and their uses.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AT 01/00387

Continuation of Box I.2.

Claim Nos.: 1-4 and 7-19 (all in part)

The search initially yielded an extremely large number of documents which are prejudicial to novelty such as, for example, 476 documents for peptides of general formula I. This number is so large that it is impossible to determine the subject matter in the claims in their entirety for which protection could possibly rightfully be sought (PCT Article 6).

The present Claims 1-4 and 7-19 relate to an extremely large number of possible compounds. In fact, they comprise so many options that they appear unclear and too broad (PCT Article 6) to the extent that they do not allow a reasonable search.

Moreover, it is not clear (PCT Article 6) what is to be understood by peptide group derived from the Aalpha or Bbeta chain of the fibrin, for example (see Claims 3 and 4). This expression can encompass a large number of compounds such as, for example, two amino acid groups that are present within the sequence of the chain and is speculative since it comprises an extremely large number of possibilities which have not yet been investigated by the applicant. The result cannot be foreseen by a person skilled in the art using the content of the present application and his specialist knowledge in order to reproduce all the claimed possibilities. Therefore, the subject matter of Claims 1-4 and 7-19 also does not comply with PCT Article 5.

For these reasons, a meaningful search of the entire scope of Claims 1-4 and 7-19 appears impossible. The search was therefore restricted to the peptides defined in Claims 5 and 6 as well as to their uses.

The applicant is advised that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AT 01/00387

Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 01/00387

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9321962	A	11-11-1993	US	5965107 A		12-10-1999
			AT	184203 T		15-09-1999
			AU	717857 B2		06-04-2000
			AU	2487997 A		04-09-1997
			AU	681080 B2		21-08-1997
			AU	4107693 A		29-11-1993
			CA	2111863 A1		11-11-1993
			DE	69326335 D1		14-10-1999
			DE	69326335 T2		03-02-2000
			EP	0637968 A1		15-02-1995
			JP	7506111 T		06-07-1995
			WO	9321962 A1		11-11-1993
			US	6086849 A		11-07-2000
			US	5849261 A		15-12-1998
			US	6093383 A		25-07-2000
			US	5922303 A		13-07-1999
			US	5776428 A		07-07-1998
			US	5780007 A		14-07-1998
			US	5720934 A		24-02-1998
			US	6074627 A		13-06-2000
DE 19729591	A	11-02-1999	DE	19729591 A1		11-02-1999
			AU	732424 B2		26-04-2001
			AU	8854998 A		08-02-1999
			WO	9902565 A2		21-01-1999
			EP	1003787 A2		31-05-2000
			JP	2001509517 T		24-07-2001
			NZ	502749 A		31-08-2001
			TR	200000954 T2		21-07-2000
US 4927916	A	22-05-1990	US	5357042 A		18-10-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

II
a) des Aktenzeichen
PCT/AT 01/00387

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/75 C07K5/083 C07K5/103 A61K38/36 A61K38/06
A61K38/07

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HARENBERG J ET AL.: "Biodistribution of human fibrinogen-derived peptides in rabbits; in: Fibrinogen: Struct. Variants Interact." 1983, DE GRUYTER, BERLIN (DE) XP008008830 Seite 271 -Seite 278	1-5
Y	---	7-19
X	WO 93 21962 A (DIATECH, INC.) 11. November 1993 (1993-11-11) Seite 10; Anspruch 4	1-5
X	IKEMATSU S: "Radioimmunoassay of fibrinopeptide" RINSHO KENSA, Bd. 28, Nr. 1, 1984, Seiten 20-24, XP001115011 Tabelle 2	1-5

	-/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

3. Oktober 2002

18/10/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schmidt, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

II
Ies Aktenzeichen
PCT/AT 01/00387

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KAWASAKI K ET AL.: "Amino acids and peptides XII: Synthetic peptides related to the N-terminal portion of fibrin alpha-chain and their inhibitory effects on fibrinogen/thrombin clotting" THROMBOSIS RESEARCH, Bd. 56, 1989, Seiten 757-762, XP008008821 das ganze Dokument ---	1-4
X	DE 197 29 591 A (THERASORB MEDIZINISCHE SYSTEME GMBH) 11. Februar 1999 (1999-02-11) Seite 4; Ansprüche 1,3 ---	1-4
X	EVERSE SJ ET AL.: "Conformational Changes in Fragments D and Double-D from Human Fibrin(ogen) upon Binding the Peptide Ligand Gly-His-Arg-Pro-Amide" BIOCHEMISTRY, Bd. 38, 18. Februar 1999 (1999-02-18), Seiten 2941-2946, XP002215499 Zusammenfassung ---	1-4
X	US 4 927 916 A (MATSUEDA ET AL.) 22. Mai 1990 (1990-05-22) Anspruch 1 ---	1-4
Y	HERRICK S ET AL.: "Fibrinogen" THE INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY, Bd. 31, 1999, Seiten 741-746, XP002215500 Seite 744 -Seite 745; Tabelle 1 ---	7-19

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen
PCT/AT 01/00387

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr. 1-4 und 7-19 (alle teilweise)
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 5 (vollständig) und 1-4,7-19 (teilweise)

Peptide der allgemeinen Formel II, worin Z5 die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 11 hat und ihre Verwendungen

2. Ansprüche: 6 (vollständig) und 1-4,7-19 (teilweise)

Peptide der allgemeinen Formel II, worin Z5 die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 12 hat und ihre Verwendungen

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-4 und 7-19 (alle teilweise)

Die Recherche ergab in ihrer Anfangsphase eine sehr große Zahl neuheitsschädlicher Dokumente, z.B. 476 Dokumente für Peptide der allgemeinen Formel I. Diese Zahl ist so groß, daß sich unmöglich feststellen lässt, für was in der Gesamtheit der Patentansprüche eventuell nach zu Recht Schutz begehrte werden könnte (Art. 6 PCT).

Die geltenden Patentansprüche 1-4 und 7-19 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen. In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar und zu weitläufig gefasst erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichten.

Weiterhin ist nicht klar im Sinne des Artikels 6 PCT, was beispielsweise mit von der Aalpha- oder Bbeta-Kette des Fibrins abgeleiteter Peptidrest gemeint ist (siehe Ansprüche 3 und 4). Dieser Ausdruck kann eine Vielzahl an Verbindungen umfassen, beispielsweise zwei Aminosäurereste, die innerhalb der Sequenz der Kette vorkommen und ist spekulativ, weil er sehr viele Möglichkeiten beinhaltet, die der Anmelder noch nicht untersucht hat. Dabei kann das Ergebnis nicht vom Fachmann vorhergesehen werden, wenn er den Inhalt der vorliegenden Anmeldung und sein Fachwissen nutzt, um alle beanspruchten Möglichkeiten zu reproduzieren. Damit widerspricht der Gegenstand der Ansprüche 1-4 und 7-19 auch dem Artikel 5 PCT.

Aus diesen Gründen erscheint eine sinnvolle Recherche über den gesamten Bereich der Patentansprüche 1-4 und 7-19 unmöglich. Die Recherche wurde daher beschränkt auf die Peptide im Sinne der Ansprüche 5 und 6 sowie ihre Verwendungen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/AT 01/00387

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9321962	A	11-11-1993		US 5965107 A AT 184203 T AU 717857 B2 AU 2487997 A AU 681080 B2 AU 4107693 A CA 2111863 A1 DE 69326335 D1 DE 69326335 T2 EP 0637968 A1 JP 7506111 T WO 9321962 A1 US 6086849 A US 5849261 A US 6093383 A US 5922303 A US 5776428 A US 5780007 A US 5720934 A US 6074627 A		12-10-1999 15-09-1999 06-04-2000 04-09-1997 21-08-1997 29-11-1993 11-11-1993 14-10-1999 03-02-2000 15-02-1995 06-07-1995 11-11-1993 11-07-2000 15-12-1998 25-07-2000 13-07-1999 07-07-1998 14-07-1998 24-02-1998 13-06-2000
DE 19729591	A	11-02-1999		DE 19729591 A1 AU 732424 B2 AU 8854998 A WO 9902565 A2 EP 1003787 A2 JP 2001509517 T NZ 502749 A TR 200000954 T2		11-02-1999 26-04-2001 08-02-1999 21-01-1999 31-05-2000 24-07-2001 31-08-2001 21-07-2000
US 4927916	A	22-05-1990		US 5357042 A		18-10-1994